

С.Б. Сеткина<sup>1</sup>, О.М. Хишова<sup>2</sup>, Л.В. Зубкевич<sup>1</sup>, А.В. Каплин<sup>1</sup>, Е.В. Каплина<sup>1</sup>

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ, СОДЕРЖАЩИХ КЛОПИДОГРЕЛЯ БИСУЛЬФАТ

<sup>1</sup>УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»

<sup>2</sup>УО «Витебский государственный медицинский университет»

*В данном исследовании была выполнена сравнительная оценка количественного и качественного содержания примесей в оригинальном и трех генерических лекарственных средствах, содержащих клопидогреля бисульфат. Для исследования были выбраны генерические лекарственные средства с наибольшим уровнем вариабельности по биофармацевтическим параметрам. Количественное и качественное определение примесей клопидогреля выполняли хроматографическим методом с УФ детектированием. Для определения содержания R-энантиомера клопидогреля использовали энантиоспецифический метод разделения с использованием хиральной колонки. По результатам исследования были установлены значимые различия содержания идентифицируемых и неидентифицируемых примесей, включая продукт энантиомерной инверсии, между генерическими и оригинальным лекарственными средствами, что может быть обусловлено существенными различиями по совокупности биофармацевтических параметров.*

*Ключевые слова:* клопидогрель, примеси, биофармацевтические факторы.

#### ВВЕДЕНИЕ

Важной составляющей фармацевтической разработки лекарственной формы является обеспечение ее стабильности при заданных условиях хранения, что означает подбор совокупности биофармацевтических факторов, гарантирующих сохранение параметров готовой лекарственной формы в рамках спецификации и требуемых параметров биодоступности. Процесс производства и хранения лекар-

ственных средств (ЛС) сопряжен с риском инициации в лекарственной форме различных физико-химических процессов, направленных, в том числе, на разрушение действующего или вспомогательных веществ с образованием соединений, отличных от них по своим физико-химическим свойствам и именуемых примесями [1]. Образование данных нежелательных компонентов даже в незначительных количествах может оказывать неблагоприятное воздействие на параметры эффективности

и безопасности ЛС. В соответствии с действующими требованиями пути образования примесей в процессе производства и хранения должны тщательно изучаться на этапе фармацевтической разработки и исследований стабильности, а их наличие и количественное содержание в последующем контролироваться.

Содержащиеся в лекарственной форме примеси могут быть разделены на две категории: примеси, связанные с процессом синтеза действующего вещества, и примеси, образующиеся в процессе производства и хранения готовой лекарственной формы в результате различных процессов деградации исходных соединений [2]. Особый интерес с точки зрения моделирования биофармацевтических факторов вызывает именно вторая группа примесей, характеризующаяся непосредственной зависимостью от различных факторов, в той или иной степени влияющих на их качественные и количественные характеристики. Данная зависимость обусловлена влиянием биофармацевтических факторов на различные механизмы разрушения действующего и вспомогательных веществ: гидролитический, окислительный, фотолитический и термолитический. Так, используемые в ходе производства высокоэнергетические технологические процессы могут внести некоторую степень аморфизации в высоkokристаллический материал, повышая тем самым локальные уровни влажности и химической активности. Использование влажной грануляции наряду с температурным режимом также может создавать условия, благоприятствующие протеканию процессов гидролитической и окислительной деградации. Крайне многоплановым может являться воздействие вспомогательных веществ на стабильность активного ингредиента, поскольку являясь, как правило, фармакологически неактивными, вспомогательные вещества, а также присутствующие примеси могут проявлять выраженную химическую активность. Механизмы реализации данного воздействия могут включать непосредственное окисление, создание среды, благоприятствующей протеканию гидролиза, каталитическое воздействие на процессы деградации и иные. Исходя из этого, обязательным этапом фармацевтической разработки должно являться изучение структуры действующего вещества, возможных

путей и условий его разрушения и проведение предварительных исследований по оценке совместимости со вспомогательными веществами в условиях стресс-тестов [3].

Влияние процессов деградации на параметры эффективности и безопасности ЛС как с точки зрения возможного появления примесей различного токсикологического профиля, так и снижения содержания действующего вещества, делает их тщательное изучение и оценку крайне критичными при выполнении технологической разработки ЛС, в особенности применяемых при жизнеугрожающей патологии. В целях оценки степени влияния различных биофармацевтических факторов на параметры стабильности ЛС со свойствами физико-химической нестабильности была выполнена работа по сравнительному изучению количественного и качественного содержания примесей в ЛС на основе клопидогреля.

Клопидогрель бисульфат (рисунок 1), метил(+)- $\alpha$ -(2-хлорфенил)-6,7-дигидротиено-[3,2-с]пиридин-5(4Н)-ацетат сульфат, относится к классу тиенопиридиновых антиагрегантных средств, широко используемых с целью предупреждения тромбообразования при коронарных, церебральных и периферических сосудистых заболеваниях. Антиагрегантное действие клопидогреля реализуется за счет необратимой блокады АДФ-зависимых P2Y<sub>12</sub> рецепторов тромбоцитов, участвующих в процессе агрегации и связывания с фибрином.

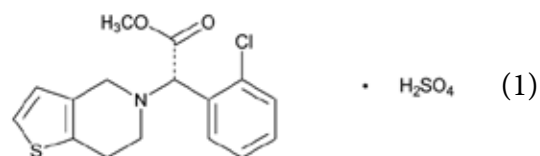


Рисунок 1 – Клопидогрель бисульфат

Клопидогрель характеризуется наличием двух стереоизомеров (R и S), при этом фармакологически активным является S-стереоизомер. R-стереоизомер (рисунок 2) характеризуется отсутствием фармакологического (антиагрегантного) действия и иным профилем безопасности. Содержание R-энантиомера контролируется в готовом лекарственном средстве как примесь С.

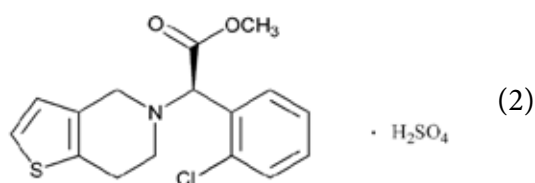


Рисунок 2 – R-стереоизомер клопидогреля

Для клопидогреля описаны пути кислотного, щелочного гидролитического разложения, окислительной и фотодегградации, а также влияние температурного фактора на процесс разрушения молекулы [4]. Клопидогрель содержит сложноэфирную группу и является соединением, легко подвергающимся гидролизу с образованием фармакологически неактивного соединения.

Продукт гидролиза клопидогреля (рисунок 3) представляет собой деметилированное соединение, его образование снижает содержание действующего вещества и контролируется в готовой лекарственной форме как примесь А. Экспериментальными данными [5] подтверждена возможность протекания в лекарственной форме клопидогреля энантиомерной инверсии с превращением активного S-энантиомера в неактивный R-энантиомер.

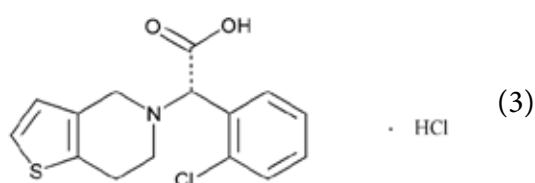
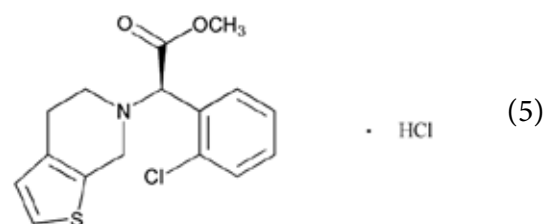
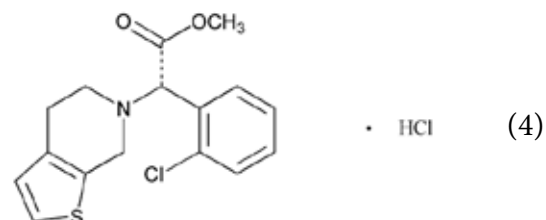
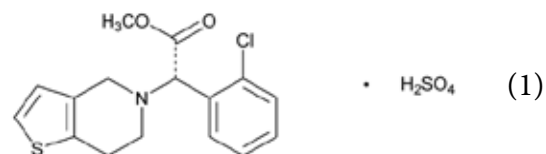


Рисунок 3 – Продукт гидролиза (деметилированное соединение) клопидогреля

Кроме того, контролируемые являются примеси В1 и В2 (рисунок 4), представляющие собой позиционные изомеры по отношению к клопидогрелю и образующиеся в процессе его синтеза. С точки зрения контроля стабильности действующего вещества и оценки влияния биофармацевтических факторов на процессы деградации, особый интерес представляет сравнительное определение в выборке генерических копий примесей А, С и ряда неидентифицируемых примесей, являющихся показателями стабильности лекарственной формы в процессе производства и хранения.



- (1) – клопидогреля бисульфат;  
 (4) – позиционный изомер (В<sub>1</sub>);  
 (5) – позиционный изомер (В<sub>2</sub>)

Рисунок 4 – Структурные (позиционные) по положению 2-ой связи в кольце тиафена изомеры, образующиеся в процессе синтеза клопидогреля

Проблема различной стабильности генерических копий клопидогреля уже являлась предметом системного изучения [5]. Так, группой исследователей под руководством E. Gomez была выполнена оценка стабильности 18 генерических копий клопидогреля по сравнению с оригинальным лекарственным средством Плавикс, в результате которой было установлено, что в 60% тестируемых ЛС содержание продуктов гидролитического расщепления и энантиомерной инверсии (примесей А и С) более чем в 4 раза превысило содержание таковых в оригинальном лекарственном средстве. С точки зрения оптимизации фармацевтической разработки данного ЛС и обеспечения требуемого уровня эффективности и безопасности на протяжении всего срока хранения крайне важным представляется определение ключевых биофармацевтических факторов, непосредственно влияющих на процессы деградации (в том числе гидролитической) и энантиомерной инверсии.

Целью исследования являлось провести сравнительную оценку содержания примесей в лекарственных средствах, со-

державших клопидогреля бисульфат, в зависимости от различных биофармацевтических факторов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения оценки влияния совокупности биофармацевтических факторов на стабильность клопидогреля была определена выборка из трех генерических ЛС, имеющих наибольший уровень вариабельности по совокупности биофармацевтических параметров, и выполнены исследования по качественной и количественной оценке примесей, включая определение неактивного энантиомера. Включенные в выборку генерические ЛС характеризовались значительными отличиями по составу, физико-химическим и функциональным свойствам вспомогательных веществ: производителями генерических ЛС использовалась лактоза, в том числе лактозы моногидрат в качестве наполнителя вместо маннитола, кальция либо магния стеарат в качестве антифрикционных веществ вместо гидрогенизированного касторового масла, а также иные комбинации дезинтегрантов. Выполненное исследование по оценке эквивалентности *in vitro* [10] показало значимые отличия между оригинальным и генерическими ЛС в оцениваемой выборке по кинетике растворения, что свидетельствует об имеющихся также отличиях в технологии производства данных ЛС.

**Образцы и реагенты.** В качестве препарата сравнения использовали оригинальное лекарственное средство Плавикс (клопидогрель), таблетки 75 мг, производства SANOFI WINTH ROPIN DUSTRIE, Франция (серия 1A118). Для оценки влияния биофармацевтических факторов на качественные и количественные параметры определяемых примесей использовали три генерических ЛС: генерическое ЛС 1 (Республика Беларусь), генерическое ЛС 2 (Украина), генерическое ЛС 3 (Индия). В качестве стандартного образца клопидогреля бисульфата использовали стандартный образец производства «Arti Drugs Ltd» (Индия), 99,97% чистоты.

При выполнении качественного и количественного определения примесей в выборке ЛС использовали следующие реагенты: ацетонитрил для ВЭЖХ, чистота более 99,8% (производство Merck KGaA (Германия); хлористоводородная кисло-

та, калия хлорид, фосфорная кислота, калия дигидрогенфосфат квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.». При проведении испытания использовали воду дионизованную, полученную с использованием установки очистки и деионизации Simplisity UV System, Millipore, Франция (сопротивление не менее 18 Мом, ТОС не более 5 мкг/л, микроорганизмы менее 1 CFU/мл).

**Оборудование.** Хроматографический анализ выполняли с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity, включающего 2-х градиентный насос, термостатируемый автосамплер, термостат колонок, диодно-матричный детектор со стандартной кюветой. При работе с получаемыми данными использовали программное обеспечение Open Lab для управления, сбора и обработки данных. Хроматографирование выполняли с использованием хиральной хроматографической колонки UltronES-OVM, диаметром 4.6 мм × 150 мм, зернением частиц 5 мкм.

**Хроматографические условия определения.** В качестве элюента использовали смесь из 75% ацетонитрила и 25% 0,01 М калия дигидрогенфосфата. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура термостата колонок – 40°, объем вводимой пробы – 1 мкл. Данные условия хроматографирования являются оптимальными для разделения примесей клопидогреля с использованием данной колонки [6-8]. Детектирование выполняли в УФ диапазоне при длине волны 220 нм, ширина оптической полосы – 16 нм. Время удерживания клопидогреля – 2,839 мин (RSD=0,4 %). Общее время одного анализа не превышало 4 мин. Валидация используемой методики анализа была выполнена в химико-аналитическом отделе Республиканской клинико-фармакологической лаборатории УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» МЗ РБ. Валидация включала определение специфичности, линейности, правильности, прецизионности, робастности (стабильность времен удерживания, симметрии/асимметрии, хроматографической эффективности) [9]. Тест пригодности хроматографической системы был выполнен с определением относительных времен удерживания исследуемых примесей по отношению к времени удерживания клопидогреля и разрешении пиков исследуемых примесей и клопидогреля.

Подготовку образцов для определения

примесей в ЛС осуществляли следующим образом. Определяли взвешиванием среднюю массу 5 таблеток (таблица 1). Затем пять таблеток каждого ЛС тщательно измельчали растиранием и отбирали по две навески измельченного порошка, эквивалентных массе одной таблетки каждого ЛС и соответственно 75 мг клопидогреля. Навески растворяли в метаноле в колбе вместимостью 25 мл. Полученные растворы фильтровали, отбирали 1,6 мл полученного раствора и разбавляли метанолом в мерной колбе вместимостью 10 мл. Расчетная концентрация клопидогреля в растворе составляет 0,48 мг/мл. Полученные растворы анализировали на содержание примесей. Однородность массы оценива-

ли путем взвешивания 5 таблеток каждого из анализируемых ЛС.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Однородность массы.** Полученные результаты (таблица 1) свидетельствовали о соответствии тестируемых образцов требованиям нормативного документа [11].

**Оценка пригодности хроматографической системы.** Данные, полученные при проведении теста пригодности системы, приведены в таблице 2 и на рисунках 5 и 6.

Полученные значения соответствуют требованиям USP- 32 и позволяют идентифицировать наличие примесей в ЛС.

Таблица 1 – Средняя масса таблеток при определении примесей в лекарственных средствах на основе клопидогреля

Масса таблеток, мг (n=5)			
Плавикс	Генерическое ЛС 1	Генерическое ЛС 2	Генерическое ЛС 3
249,8	208,9	262,4	305,8
245,8	210,0	265,9	298,8
252,4	208,6	259,2	303,8
244,9	210,3	257,7	298,9
258,7	205,1	260,5	303,7
Ср. =250,3	Ср. = 208,6	Ср. = 261,1	Ср. = 302,2
Откл. = 5,6	Откл. = 2,1	Откл. = 3,2	Откл. = 3,2
RSD,% = 2,2	RSD,% = 0,99	RSD,% = 1,2	RSD,% = 1,0

Таблица 2 – Пригодность хроматографической системы при разделении примесей в ЛС на основе клопидогреля

Наименование соединения	Время удерживания, мин (n=2-3)	Относительное время удерживания	Разрешение
Примесь В1	5,936; 5,942; 5,949 Ср. знач.= 5,942 (RSD=0,11%)	0,84	2,922
Клопидогрель	7,066; 7,081; 7,088 Ср. знач.= 7,078 (RSD=0,16%)	1,00	-
Примесь В2	7,984; 7,996; 7,999 Ср. знач.=7,993 (RSD=0,09%)	1,13	-
Примесь А	3,996; 3,998 Ср. знач.= 3,997 (RSD=0,035 %)	0,56	-
Примесь С	12,750; 12,722 Ср. знач.= 12,736 (RSD= 0,155 %)	1,8	-

**Оценка количественного содержания примесей в тестируемых ЛС.** Результаты оценки качественного и количественного содержания примесей в тестируемых клопидогрельсодержащих ЛС приведены в таблице 3.

В отношении примеси А (продукта гидролитического расщепления) выявлено 11-кратное превышение ее содержания

в генерических ЛС 1 и 2 по сравнению с оригинальным ЛС. В генерическом ЛС 3 содержание данной примеси превысило таковое в оригинальном ЛС в 5 раз. Содержание неактивного энантиомера (примесь С) варьировало в генерических копиях существенно, превышая таковое в оригинальном ЛС от 3,4 (генерическое ЛС 1) до 4,9 раз (генерическое ЛС 2). Общее

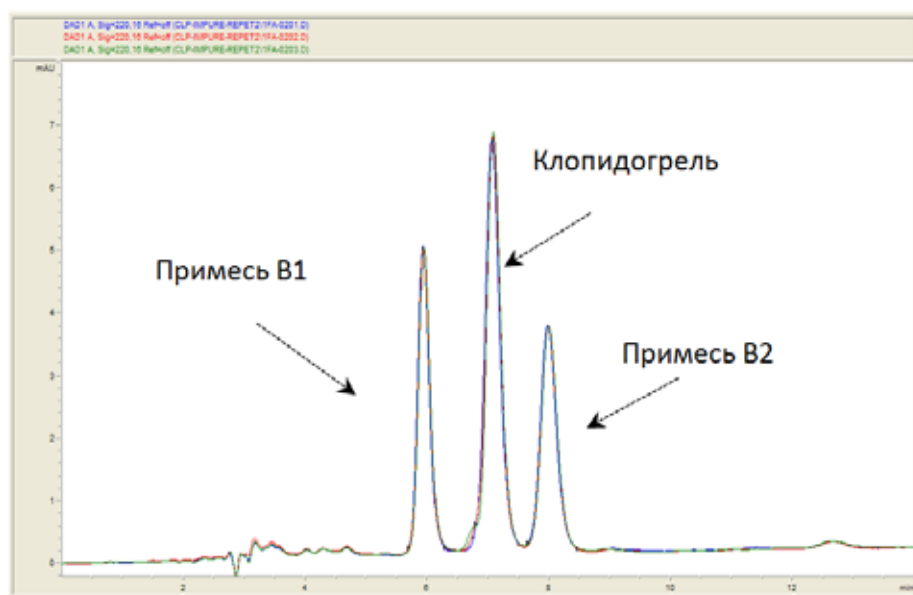


Рисунок 5 – Хроматографическая пригодность разделения клопидогреля и примесей В1 и В2



Рисунок 6 – Хроматографическая пригодность разделения клопидогреля и примесей А и С

Таблица 3 – Содержание примесей в исследуемых ЛС

Наименование примеси	Площади пиков примесей			
	Плавикс	Генерическое ЛС 1	Генерическое ЛС 2	Генерическое ЛС 3
Примесь А	1,9	21,8	21,3	9,5
Примесь В1	6,1	22,1	3,6	0,74
Примесь В2	-	-	-	-
Примесь С	25,5	87,3	126	7,3
Сумма площадей идентифицируемых примесей	33,5	131,2	150,9	17,5
Сумма примесей тестируемых ЛС по отношению к ЛС Плавикс	1	3,9	4,5	0,52

содержание идентифицируемых примесей превысило референтные значения в 3,9 (генерическое ЛС 1) и 4,5 (генерическое ЛС 2) раза, для генерического ЛС 3 соот-

ношение 0,52 обусловлено более низким содержанием примеси С при превышении содержания примеси А. Обращает на себя внимание (рис. 10) наличие и значитель-



Рисунок 7 – Совмещенные хроматограммы примесей клопидогреля генерического ЛС 1



Рисунок 8 – Совмещенные хроматограммы примесей клопидогреля генерического ЛС 2

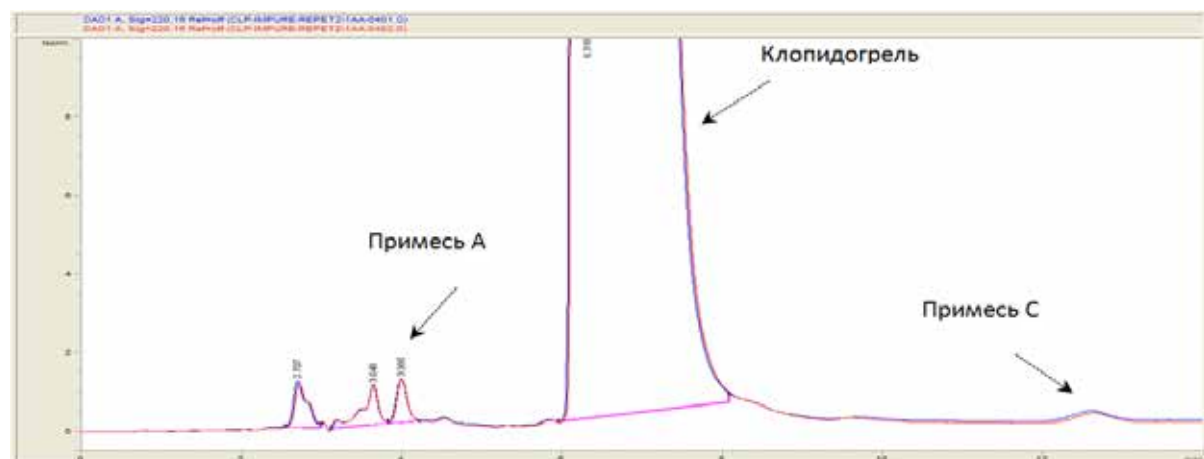


Рисунок 9 – Совмещенные хроматограммы примесей клопидогреля генерического ЛС 3

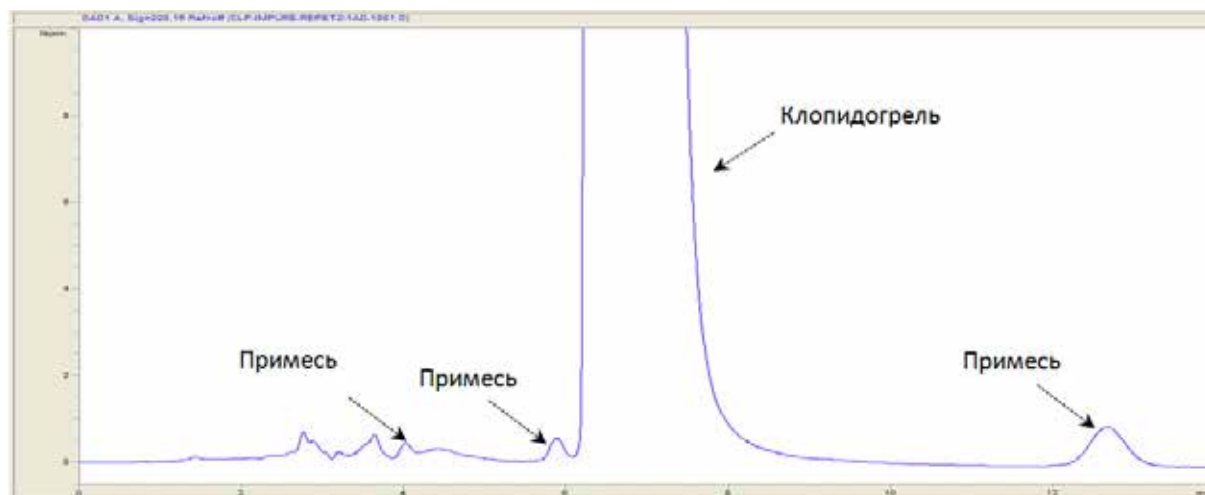


Рисунок 10 – Совмещенные хроматограммы примесей клопидогреля ЛС Плавикс

ное содержание в генерических копиях ряда неидентифицируемых примесей в зоне примеси А (продукта гидролитического разложения), что может свидетельствовать о наличии ряда иных примесей, представляющих собой продукты разложения клопидогреля. Исследовательской группой под руководством *А. Mohan* [4] была определена структура одной из неидентифицируемых примесей клопидогреля, выявляемая в зоне близкой к примеси А, обозначенная как примесь Д и являющаяся продуктом окисления клопидогреля. Для генерических ЛС 1 и 2 характерно наибольшее содержание неидентифицированных примесей в данной зоне, практически не определяемых в оригинальном ЛС.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено существенное (от 5 до 11 раз) превышение содержания продукта гидролитического расщепления (примеси А) в генерических ЛС, содержащих клопидогрель, по сравнению с оригинальным лекарственным средством. Содержание неактивного R-энантиомера превысило таковое значение в оригинальном лекарственном средстве от 3,4 до 4,9 раз в генерических ЛС 1 и 2, соответственно. Существенные отличия по качественному и количественному содержанию неидентифицированных примесей в зоне идентификации продуктов окислительной и гидролитической деградации также определены для генерических копий 1 и 2. Полученные данные согласуются с данными других ис-

следователей [5], выявивших существенную вариабельность по данному показателю стабильности в выборке генерических ЛС, содержащих клопидогрель.

Таким образом, выявленные в ходе данного исследования различия в содержании продуктов разложения и энантиомерной инверсии в выборке генерических копий, характеризующихся определенными отличиями по совокупности биофармацевтических параметров, свидетельствуют о важности тщательного изучения на этапе фармацевтической разработки совместимости действующего вещества со вспомогательными веществами, а также путей и условий его деградации в особенности в случае соединений, характеризующихся свойствами физико-химической нестабильности.

### SUMMARY

S.B. Setkina, O.M. Khishova,  
L.V. Zubkevich, A.V. Kaplin, E.V. Kaplina  
COMPARATIVE TESTING OF  
THE CONTENT OF IMPURITIES  
IN MEDICINES CONTAINING  
CLOPIDOGREL BISULPHATE

In this study the comparative evaluation of qualitative and quantitative content of impurities in three clopidogrel bisulphate-containing generic copies in compare with the innovator drug product has been performed. For comparative testing the generic products with the highest variability on the biopharmaceutical parameters were chosen. Chromatographic method with UV detection was used for qualitative and quantitative determination



of the impurities. An enantiospecific method with use of the chiral column was applied for separation of R-enantiomer of clopidogrel. By study results significant difference in the content of identified impurities, including the product of enantiomer inversion, was identified between the innovator and generic products, that could be related to differences in several biopharmaceutical parameters.

Keywords: clopidogrel, impurities, biopharmaceutical factors.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jiben, Roy. Pharmaceutical impurities – A Mini Review. / R.Jiben //AAPS Pharma Sci Tech. – 2002. – 3(2). – P. 1–8.
2. Guidance for Industry. Q3A Impurities in New Drug Substances. U S Department of Health and Human Services. Food and Drug Evaluation and Research. – June 2008. – ICH. Revision 2.
3. Michael, K. Forced Degradation Studies:Regulatory Considerations and Implementation Stress testing studies are conducted to challenge specificity of stability-indicating and impurity-monitoring methods as part of validation protocol / K. Michael // BioPharmInt. – 2005. – P. 1–7.
4. Mohan, A. Identification and characterization of a principal oxidation impurity in clopidogrel drug substance and drug product / A. Mohan // J. Pharm Biomed Anal. – 2008. № 47 (1). – P. 183-189.
5. Gomez, Y. Analysis of purity in 19 drug products tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand // Y.Gomez, E. Adoms, J. Hoogmartens // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – № 34. – P. 341-348.
6. Development of Normal Phase Chiral Liquid Chromatographic Method for determination of Methyl (-) - (R) - (o-chlorophenyl) -6, 7- dihydrothieno [3, 2-C] pyridine -5(4H)-acetate, hydrogen sulphate from ClopidogrelBesylate. / P. Pawaskar [et al.]// Int. J. Pharm Sci. – 2013. – №5(1). –

P. 1971-1976.

7. Physico-Chemical Studies on Stability Clopidogrel Tablet Formulation / Y. Sanjeva [et al.] //Int. J. Pharm Bio Sci. – 2012; 3(4). – P. 433-439.

8. Development of Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for Determination of (+)-(S)-(o-Chlorophenyl)-6,7-Dihydrothieno [3,2-c] pyridine-5(4H)-acetic acid,Hydrochloride and Methyl (+/-) - (o-Chloro phenyl)-4,5-Dihydrothieno[2,3-c] pyridine-6(7H)-acetate, Hydrochloride from Clopidogrel Besylate. / P.S. Pawaskar [et al.] // Int. J. Pharm. Res. Sch. – 2013. – № 2(1). – P. 16-23.

9. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 21 July 2011.

10. Влияние биофармацевтических факторов на эквивалентность *in vitro* воспроизведенных лекарственных средств на основе клопидогреля /С.Б. Сеткина [и др.] // Вестник фармации. – 2014. – № 1(63). – С. 33-38.

11. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля лекарственных средств. Регистрационные требования и правила проведения исследований биодоступности и биоэквивалентности генерических лекарственных средств. 2.9.3. Тест «Растворение» для твердых дозированных форм /М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общей ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012 – С. 430.

#### Адрес для корреспонденции:

220037, Республика Беларусь,  
г. Минск, пер. Товарищеский, 2а,  
УП «Центр экспертиз и испытаний  
в здравоохранении»,  
тел. + 17 299 53 58,  
rcpl@rceth.by.  
Сеткина С.Б.

Поступила 21.04.2014 г.